家蚕基因组靶向编辑技术研究进展

龙定沛，郝占章，向仲怀，赵爱春*

（西南大学蚕学与系统生物学研究所，家蚕基因组生物学国家重点实验室，
农业部蚕桑功能基因组与生物技术重点实验室，重庆 400716）

摘要：人工核酸内切酶(engineered endonuclease, EEN)系统介导的基因组编辑技术是进行基因组功能研究与生物遗传改良操作的重要工具。家蚕 *Bombyx mori* 是最早实现人工驯化和饲养的经济昆虫，同时也是后基因组时代用作功能基因分析的重要鳞翅目模式昆虫。近年来随着锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)以及 CRISPR/Cas9 系统介导的新型基因组靶向编辑技术的快速发展，家蚕基因组靶向编辑技术的研究和应用也取得了重要进展。本文概述了目前最为常用的 3 种 EEN 介导的基因组靶向编辑系统的组成和作用原理，全面系统地介绍了家蚕基因组靶向编辑技术的建立过程以及该技术介导实现家蚕内源或外源基因定点突变、基因组结构变异和外源基因在家蚕基因组定点整合操作的应用研究进展，探讨了家蚕基因组靶向编辑技术存在的内源靶基因定点敲除与外源基因定点整合效率较低、外源基因整合的"脱靶效应"等主要问题及相应解决策略，并对利用该技术实现家蚕多基因同时修饰的潜力和多种基因组靶向编辑系统的联合应用与多元化开发的发展趋势进行了展望，以期为推动基因组靶向编辑技术在昆虫基因功能分析、突变模型建立等研究领域的发展提供借鉴与参考。

关键词：家蚕；基因组编辑；人工核酸内切酶；基因操作；ZFN；TALEN；CRISPR/Cas9

中图分类号：Q966 **文献标识码：**A **文章编号：**0454-6296(2018)03-0371-14

Progress in targeted genome editing technology in the silkworm, *Bombyx mori*

LONG Ding-Pei, HAO Zhan-Zhang, XIANG Zhong-Huai, ZHAO Ai-Chun* (State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, Institute of Sericulture and Systems Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: The engineered endonuclease (EEN)-based genome editing technology is an important tool for genome function analysis and genetic improvement of biological varieties. The silkworm, *Bombyx mori*, is the first economic insect to be domesticated and bred by humans, and also an important model lepidopteran, which has been used for functional gene analysis in the post-genome era. In recent years, along with the rapid development of zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN) and CRISPR/Cas9 system-based novel genome editing technologies, the targeted genome editing technology in the silkworm also has had significant progress. In this review, the compositions and action principles of the three most commonly used EEN systems were introduced, and

基金项目：国家蚕桑产业技术体系岗位专家项目(CARS-18-ZJ0201)；重庆市基础科学与前沿技术研究专项(cstc2016jcyjA0237)；中央高校基本科研业务费项目(XDJK2016C089)；广西科学研究与技术开发计划课题(桂科合 1599005-2-16)

作者简介：龙定沛，男，1986 年 11 月生，重庆永川人，博士，助理研究员，研究方向为蚕桑遗传育种学，E-mail: dplong@yeah.net

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhaoaichun@hotmail.com; zhaoaichun@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-10-14; 接受日期 Accepted: 2018-01-04

the establishment process of targeted genome editing technology in the silkworm and the application and research progress of this technology for point mutation of silkworm endogenous or exogenous genes, genome structure variation and integration of the exogenous genes into the silkworm genome were comprehensively and systematically summarized. This review also discussed the main problems and the corresponding strategies for the low-efficiency of the knockout of endogenous genes and integration of exogenous genes, and the off-target effects of the integration of exogenous genes in targeted genome editing techniques in the silkworm. In addition, the potential for multiplex gene editing and the development trend for the combined application and diversified development of different targeted genome editing systems of this technology in the silkworm were prospected. It is expected to provide insights and references for promoting the development of targeted genome editing technology in gene functional analysis, mutation model establishment and other research areas in insects.

Key words: *Bombyx mori*; genome editing; engineered endonuclease; gene manipulation; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas9

基因组编辑(genome editing)是一种通过插入、缺失或替换等手段,对目的基因组进行定点改造的技术。利用基因组编辑技术既能够以突变基因代替正常基因来研究基因的功能,又能够以正常基因代替突变基因来进行基因治疗,因而该技术在基因功能分析和疾病的基因治疗研究方面具有广阔应用前景。广义的基因组编辑技术按照其发展历程主要包括:基于同源重组(homologous recombination, HR)系统的完全基因打靶技术(complete gene targeting)、基于位点特异性重组系统(site-specific recombination system)的条件基因打靶技术(conditional gene targeting)和基于人工核酸内切酶(engineered endonuclease, EEN)系统的基因组靶向编辑技术。狭义的基因组编辑技术特指分别基于锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关核酸酶 Cas9(CRISPR-associated nuclease Cas9)系统(即 CRISPR/Cas9 系统)的 3 种不同 EEN 介导的新型基因组靶向编辑技术。自 Kim 等(1996)首次成功建立能靶向结合特定 DNA 位点并诱发双链断裂的人工 ZFN 技术以来,基因组靶向编辑技术已经日臻成熟。目前,上述 3 种基因组靶向编辑技术已经被广泛应用于后基因组时代的拟南芥 *Arabidopsis thaliana*、烟草 *Nicotiana tabacum*、水稻 *Oryza sativa*、小麦 *Triticum aestivum* 等植物和小鼠 *Mus musculus*、斑马鱼 *Danio rerio*、秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 等动物,实现对宿主内源基因的定点敲除及外源基因的定点整合操作,并逐渐在生命科学基础理论研究、经济物种遗传改良以及人类疾病预防与治疗等领域发挥了巨大作用(Gaj *et al*., 2013)。

家蚕 *Bombyx mori* 是最早实现人工驯化和饲养的经济昆虫。家蚕具有生命周期短、生长速度快、适宜大规模饲养和遗传背景清楚等特点,同时也是后基因组时代用作功能基因分析的重要鳞翅目模式昆虫(Xia *et al*., 2014)。基因组靶向编辑技术是家蚕后基因时代进行基因功能分析和遗传改良的重要工具。随着近年来基于 ZFN, TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统的基因组靶向编辑技术的快速发展,家蚕基因组靶向编辑技术的研究和应用也取得了重要进展。本文就目前最为常用的基于 EEN 的基因组靶向编辑系统的组成和作用原理进行概述,并对家蚕基因组靶向编辑技术的建立及应用、存在的问题和发展趋势进行讨论。

1 基因组靶向编辑技术概述

在生物进化过程中,真核生物细胞经演化形成了多种不同的 DNA 损伤修复机制,用于避免 DNA 损伤所引发的基因组不稳定现象(图 1)。其中机体对 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB)的修复主要依赖于非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)与同源定向修复(homology-directed repair, HDR)这 2 种修复机制(Wyman and Kanaar, 2006)。此外,依赖于单链退火(single strand annealing, SSA)和新近发现的微同源介导末端连接(microhomology-mediated end-joining, MMEJ)修复机

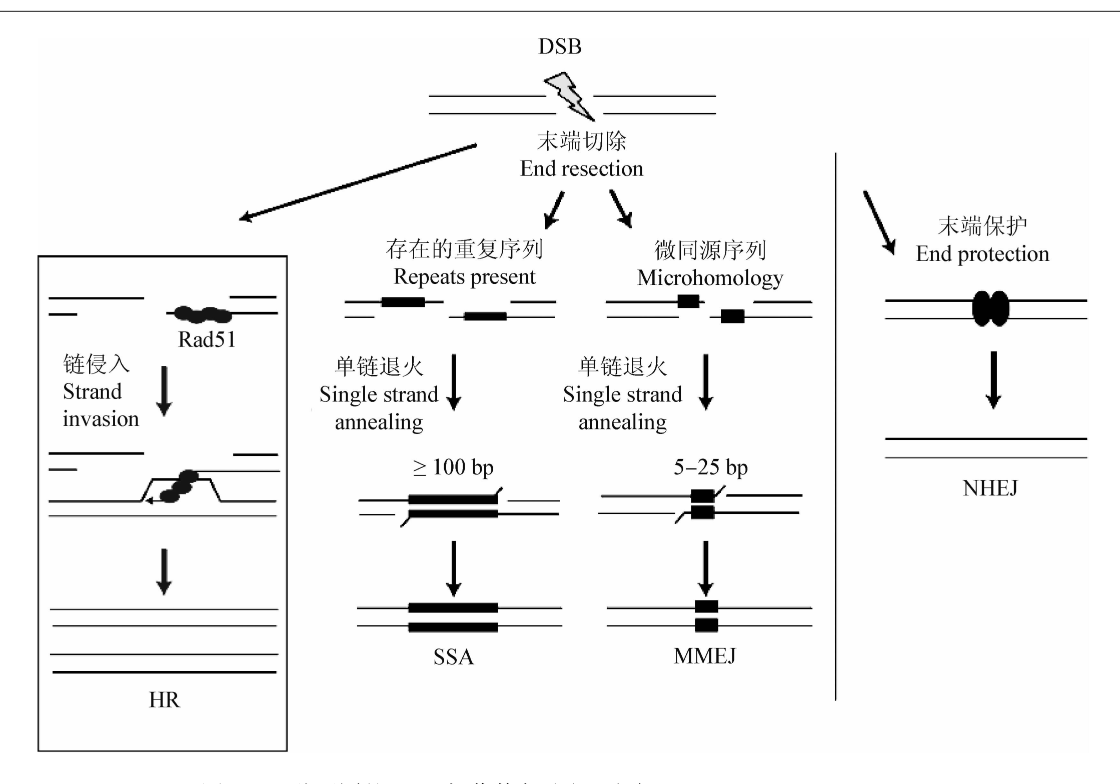


图 1　几种不同的 DNA 损伤修复途径（改自 Jasin and Rothstein，2013）

Fig. 1　Several different pathways of repairing DNA damage (adapted from Jasin and Rothstein，2013)

DSB：双链断裂 Double-strand break；HR：同源重组 Homologous recombination；SSA：单链退火 Single strand annealing；MMEJ：微同源介导末端连接 Microhomology-mediated end-joining；NHEJ：非同源末端连接 Non-homologous end joining.

制实现的 DSB 修复也已经得到证实（Jasin and Rothstein，2013）。由于 DNA 损伤会造成严重后果，细胞对于 DNA 损伤的感应与修复通常是非常灵敏和高效的，而基因组靶向编辑技术正是建立在机体 DNA 损伤修复机制原理基础上的基因组编辑技术。基于 ZFN，TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统发展起来的新型基因组靶向编辑技术，即通过借助分子生物学手段，经人为设计将天然存在的能够靶向识别并结合特定 DNA 序列的蛋白和核酸内切酶融合形成 EEN，随后靶向切割基因组 DNA 形成 DSB，进而通过 DSB 激活机体自身的 DNA 损伤修复途径实现对基因组靶位点 DNA 的删除、替换、插入等定点修饰。

1.1　ZFN 的组成及作用原理

锌指核酸酶（ZFN）又名锌指蛋白核酸酶，是一种由锌指蛋白串（zinc finger array，ZF array）与非特异性的 FokⅠ核酸酶融合而成的 EEN，也被称为第一代可编辑的 EEN（Kim *et al.*，1996）。其中，组成 ZF array 的锌指蛋白（zinc finger protein，ZFP）具有 2 个以上的手指状结构域，是广泛存在于许多转录因子中的核心结构域，能识别并结合特异 DNA 序列，FokⅠ则通过二聚化产生内切酶活性，进而对靶序列 DNA 进行切割形成 DSB（Carroll，2011）。

保守结构域中含有 2 个 Cys 与 2 个 His 的 C2H2 型 ZFP 是真核生物中存在最为广泛的 DNA 结合基序（Miller *et al.*，1985），能够介导蛋白质与核酸、小分子或其他蛋白质的相互作用。这类 ZFP 由约 30 个氨基酸折叠形成 β-β-α 结构，其中构成 α-螺旋的氨基酸可识别并结合 DNA 双链沟槽中的连续 3 个碱基（Beerli and Barbas，2002）。通常情况下，由 3～6 个 C2H2 型 ZFP 串联组成的 ZF array 能特异性识别 9～18 bp 的 DNA 序列（Liu *et al.*，1997），由此可见理论上至少需要构建 64 种 ZFP 单体的 ZF array，才能满足针对基因组任意序列的特异识别和切割，而 18 bp 的 DNA 序列即可保证靶位点的特异性。

来源于 IIS 型限制性内切酶的FokⅠ能够特异识别双链 DNA 靶位点，随后二聚化的FokⅠ切割结构域非特异性切割靶位点下游的 DNA 双链（Kim *et al.*，1996）。利用该特性将单个FokⅠ切割结构域和 ZFP 的 C 端融合构成 ZFN 单体（zinc finger nuclease monomer）。在切割过程中，2 个 ZFN 单体分别利用 ZF array 识别并结合 5′→3′方向和 3′→5′方向的 DNA 靶序列；当 2 个识别靶序列的间隔区（spacer）符合一定要求时（通常为 5～7 bp），2 个FokⅠ切割

结构域二聚化并切割 spacer 产生 DSB 切口(Porteus and Carroll, 2005);机体对 DSB 进行修复时,如果存在一段双链或单链同源序列,则通过 HR 或 SSA 修复机制促使基因组实现 DNA 定点插入或置换(Jasin and Rothstein, 2013);如果不存在同源序列,机体则以 NHEJ 方式修复 DSB,继而引发靶位点序列的定点突变(Jasin and Rothstein, 2013)。

目前开发的 ZFP 单体尚不能满足靶向任意序列,再加上靶向 GNN 三联体(GNN triplet)的 ZFP 组成的 ZF array 要优于靶向其他三联体(包括 ANN, CNN 和 TNN 三联体)的 ZF array,从而极大地提升了 ZFN 的设计与构建难度(Carroll *et al*., 2006)。此外,虽然有如 Sangamo 等商业化公司可提供较高特异性的产品化 ZFN,但是创制 ZFN 的费用仍旧十分昂贵;一般研究者难以获得有效的 ZFN,这也是限制基于 ZFN 的基因组靶向编辑技术广泛应用的重要原因之一。

1.2 TALEN 的组成及作用原理

自 2009 年开始,研究人员逐渐将注意力集中到一种名为类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)的第二代可编辑 EEN 介导的基因组靶向编辑技术(Jens *et al*., 2009; Moscou and Bogdanove, 2009; Miller *et al*., 2011; Zhang *et al*., 2011)。

TALEN 由改造后能够靶向识别特异 DNA 序列的类转录激活因子效应物蛋白串(TALE array)与非特异性的单个FokⅠ切割结构域融合构成(Heidi and Jens, 2011)。TALE 蛋白最早是从植物病原体黄单胞杆菌 *Xanthomonas* spp. 中发现的一种类似转录激活因子的蛋白(Boch and Bonas, 2010),主要由含有核定位信号(nuclear localization signal)与转录激活结构域(activation domain)的 C 端、含有转运结构域(translocation domain)的 N 端以及能够与 DNA 进行特异性结合的中间结构区域这 3 个部分组成(Gaj *et al*., 2013)。

TALE 蛋白的中间结构域是一段由 1.5 ~ 33.5 个 TALE 单元组成的重复氨基酸序列,其中每个 TALE 单元又包含 33 ~ 35 个氨基酸,位于重复区域末尾的 0.5 个 TALE 单元由 20 个氨基酸组成(Boch and Bonas, 2010)。TALE 单元第 12 和 13 位的氨基酸残基被称为重复可变双残基(repeat variable diresidue, RVD),除此之外的其他氨基酸高度保守。RVD 决定了 TALE 单元特异性识别并结合单个碱基的特异性,4 种不同碱基 A, T, C 和 G 对应的 RVD 分别是 NI(Asn-Ile), NG(Asn-Gly), HD(His-Asp)和 NN(Asn-Asn)(Gaj *et al*., 2013)。掌握 TALE 单体与碱基的识别机制后,理论上即可根据任意的特异性 DNA 序列设计和构建 TALE array,并将其与单个FokⅠ切割结构域连接以获得具有高效、特异性切割活性的 TALEN。与 ZFN 的切割方式相同,由于二聚化形式的FokⅠ切割结构域才具有切割活性,因此每次切割至少需要 1 对 TALEN 共同参与。由于每个 TALE 单体只能靶向识别并结合 1 个核苷酸,并且不同 TALE 单体随机组合形成 TALE array 并不产生显著的干扰效应,从而使得 TALEN 既能够像 ZFN 一样精确地修饰复杂的基因组,又具有比 ZFN 更易设计、构建灵活度高、成本低等优点。

1.3 CRISPR/Cas9 系统的组成及作用原理

Ishino 等(1988)发现了 K12 大肠杆菌碱性磷酸酶基因附近的串联间隔重复序列,随后的研究显示这种间隔重复序列广泛存在于细菌和古细菌的基因组中。Jansen 等(2002)根据该特异序列的结构特点,将其正式命名为成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)。此外,Jansen 等(2002)还在 CRISPR 附近发现了 CRISPR 相关的 *Cas* 基因。Marraffini 和 Sontheimer(2009)率先证明了 CRISPR 与 Cas 蛋白联合具有切割 DNA 的能力。近年来,经过众多科学家的共同努力,最终以来源于化脓链球菌 *Streptococcus pyogenes* 的Ⅱ型 CRISPR/Cas 免疫系统为基础,成功建立了目前应用最为广泛的第三代可编辑 EEN——CRISPR/Cas9 系统介导的基因组靶向编辑技术(Jinek *et al*., 2012; Cong *et al*., 2013; Mali *et al*., 2013)。

相较于 ZFN 和 TALEN,CRISPR/Cas9 系统介导的基因组靶向编辑在原理上是全新的,其靶标序列的特异性决定于一段与靶标序列互补的较短 RNA。目前最为常用的 CRISPR/Cas9 系统是将 CRISPR 元件转录生成的 CRISPR RNA(crRNA)和 trans-activating-CRISPR RNA(tracrRNA)这 2 个非编码 RNA 改造成一种单导向 RNA(single-guide RNA, sgRNA)。sgRNA 能够引导 Cas9 蛋白结合并切割靶位点 DNA 序列(Jinek *et al*., 2012; Ramalingam *et al*., 2013)。CRISPR/Cas9 系统实际切割基因组靶位点序列的主要过程如图 2 所示:(1)经人工设计合成 CRISPR 的转录加工产物——具有靶向性的 crRNA 和 tracrRNA 组合而成的 sgRNA(Marraffini and Sontheimer, 2010);(2)sgRNA 与 Cas9 蛋白形成 sgRNA-Cas9 蛋白复合体,由 crRNA 中的特异性序列引至紧挨前间区序列邻近基序(protospacer adjacent

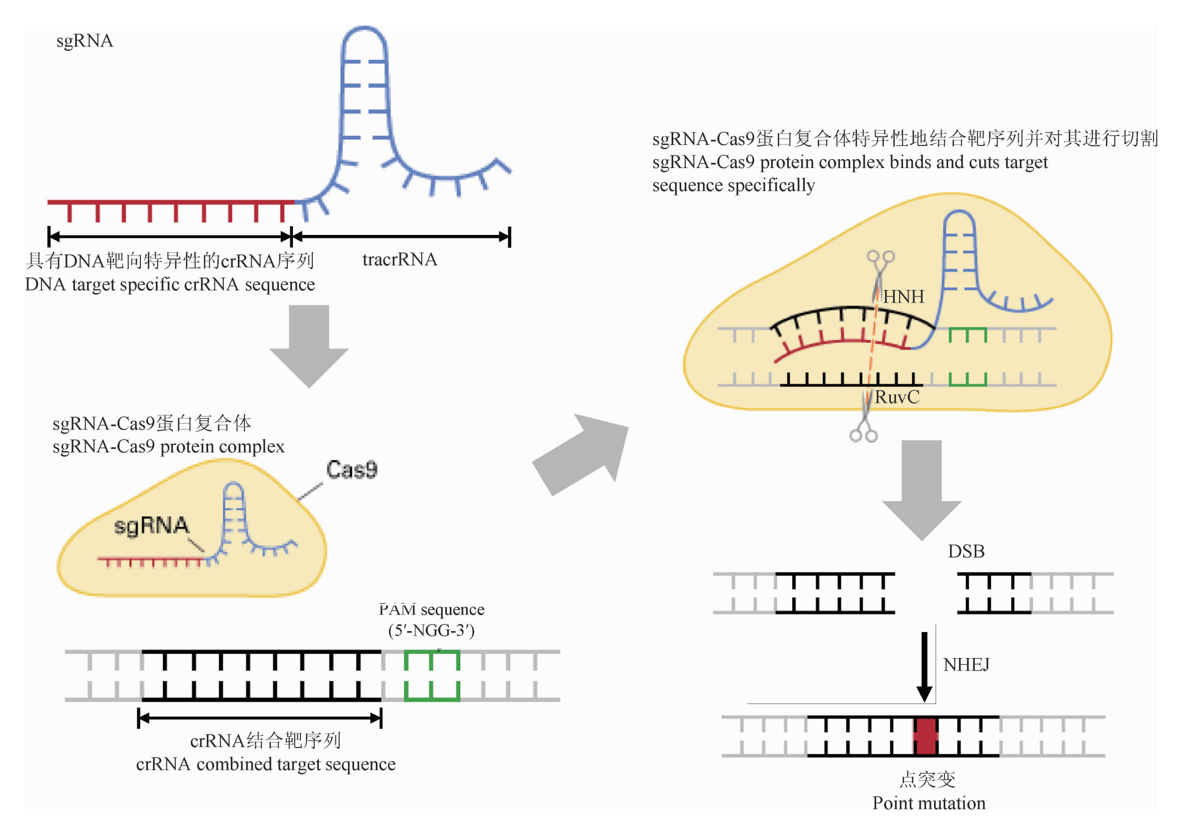


图 2　CRISPR/Cas9 系统介导的 DNA 损伤修复过程(改自 Clontech 公司产品说明)

Fig. 2　The CRISPR/Cas9 system-mediated DNA damage repair process (adapted from Clontech's product descriptions)

PAM：前间区序列邻近基序 Protospacer adjacent motif；DSB：双链断裂 Double-strand break；NHEJ：非同源末端连接 Non-homologous end joining.

motif, PAM)的 DNA 靶序列(crRNA 结合靶序列)(Jinek *et al.*, 2012)；(3)sgRNA 中具有靶向特异性的 crRNA 结构与 DNA 靶位点序列以碱基互补配对结合并启动 Cas9 核酸酶切割 DNA 双链,其中 Cas9 蛋白的 HNH 核酸酶结构域剪切互补链,而 Cas9 的 RuvC-like(RuvC)结构域剪切非互补链,从而在靶位点产生 DSB(Makarova *et al.*, 2011；Jinek *et al.*, 2012)；(4)机体通过 NHEJ 等修复方式对 DSB 进行修复,并在修复过程中引入点突变。

sgRNA-Cas9 蛋白复合物仅需要在 sgRNA 引导下识别 23 bp 靶位点序列(包括 20 bp 结合位点序列和 3 bp PAM 序列),并通过碱基互补配对原则结合 20 bp 靶序列,这种结合方式比 ZFP 及 TALE 蛋白通过蛋白质与 DNA 之间相互作用的结合方式更加稳定和简单。此外,CRISPR/Cas9 系统与 ZFN 及 TALEN 相比,其主要优势在于可针对多个基因设计 sgRNA,并在一次打靶中同时完成多基因突变(Cong *et al.*, 2013；Wang *et al.*, 2013b；Zhou *et al.*, 2014),利用该策略即可实现基因簇删除、多基因删除、调控区域删除、外源标记基因的大片段删除等同时修饰不同靶位点的需求(Canver *et al.*, 2014；Han *et al.*, 2014；据存祥等, 2015)。

2　家蚕基因组靶向编辑技术的建立及应用

2.1　家蚕基因组靶向编辑技术的建立

文献记载的对家蚕内源基因进行定向遗传操作的最早报道为 Yamao 等(1999)尝试通过同源重组原理,借助杆状病毒将绿色荧光蛋白(GFP)基因定点插入到家蚕丝素轻链基因第 7 个外显子。随后,国内也相继出现了利用基于同源重组的基因打靶策略实现外源片段在家蚕基因组定点插入的少量研究报道(Wu and Cao, 2004；Li *et al.*, 2010；Xue *et al.*, 2012)。但是由于家蚕中的同源重组效率太低、外源基因整合不稳定以及实验的可重复性差等缺点,导致这种基于同源重组的完全基因打靶方法并未在家蚕遗传操作研究领域得到普遍应用。

Fujii 等(2008)发现因幼虫真皮细胞中尿酸盐结晶含量降低,而使体壁呈现透明状“油蚕”表型的突变体家蚕 *od*,其基因组 Z 染色体上的 *BmBLOS2* 基因外显子发生了缺失突变。随后,Fujii 等(2010)

通过转基因回补实验证实，*BmBLOS*2 作为尿酸合成代谢途径中的关键基因发生敲除突变是导致 *od* 家蚕幼虫呈现“油蚕”表型的根本原因。同年，Takasu 等(2010)以 *BmBLOS*2 基因和另一个同样促进家蚕表皮尿酸颗粒合成的必需基因 *Bmwh*3 为靶基因，分别设计合成用于靶向敲除这 2 个基因的 ZFN mRNA，随后通过胚胎注射将其导入 G_0 代家蚕受精卵，结果在 G_0 家蚕中均观察到了嵌合体“油蚕”表型，并最终筛选获得了 *BmBLOS*2 基因敲除纯合 G_1 代突变家蚕个体。Takasu 等(2010)的研究结果对家蚕基因组靶向编辑研究的发展起到了里程碑式的作用。在此后的 2 年时间里，家蚕基因组国家重点实验室的 Ma 等(2012)和中国科学院上海植物生理生态研究所的 Wang 等(2013c)分别利用 TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统介导的基因组靶向编辑技术实现了对 *BmBLOS*2 基因的定点敲除，并获得了阳性纯合突变体家蚕。随后，来自日本国立农业生物资源研究所、日本信州大学纤维学部以及浙江大学动物科学学院的研究人员，相继利用基于 TALEN 或 CRISPR/Cas9 系统的基因组靶向编辑技术实现了对家蚕 *BmBLOS*2(Sajwan *et al*., 2013)、*Bm-re*(Sajwan *et al*., 2013)、*BmFib-H*(Wang and Nakagaki, 2014)和 *Bm-ok*(Wei *et al*., 2014)等内源基因的定点敲除。Wang 等(2013a)和 Takasu 等(2013)分别利用 Golden Gate 组装体系建立了一套适用于家蚕的 TALE 核苷酸骨架组装方法。Liu 等(2014)将 sgRNA 和 Cas9 核酸酶表达载体质粒混合导入体外培养家蚕细胞，实现了对家蚕细胞基因组靶位点的精确定点敲除与染色体结构变异操作，并证实 CRISPR/Cas9 系统具有在家蚕细胞和胚胎中介导实现多基因敲除的潜力。自此，分别由 ZFN, TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统这 3 类 EEN 系统介导的基因组靶向编辑技术均已经在日本和中国的多个研究机构成功建立并逐步完善，截止 2017 年 6 月底，已经有超过 40 篇涉及家蚕基因组靶向编辑技术应用研究的 SCI 论文发表(表 1)，这些成果极大地推动了后基因组时代家蚕基因功能解析的基础研究与家蚕素材创新的应用研究发展。

目前，利用基因组靶向编辑技术实现对家蚕基因组操作的类型主要包括：家蚕内源和外源基因的定点突变敲除、基因组结构变异以及外源基因在家蚕基因组定点整合。通过上述基因组操作建立的基因敲除突变体家蚕模型，已经被广泛用于对家蚕未知内源基因的功能分析与鉴定(Yoda *et al*., 2014; Enya *et al*., 2015)、蚕丝合成与分泌机制研究(Xin *et al*., 2015)、变态发育的激素调控研究(Daimon *et al*., 2015)、性别调控研究(Xu *et al*., 2014)以及转基因家蚕丝腺生物反应器开发等领域(Ma *et al*., 2014b; Wang and Nakagaki, 2014)。此外，研究人员还曾将家蚕基因组靶向编辑技术与基于转座子的家蚕转基因技术联合应用于转基因家蚕抗性育种研究。

2.2 家蚕内源基因定点突变操作

利用基因组靶向编辑技术介导含有靶位点的内源基因敲除，是研究生物内源编码基因功能的最主要手段之一。目前，基于家蚕基因组靶向编辑技术实现的家蚕内源基因定点突变操作，主要被应用于以下 3 个方面：

(1)正向遗传学的基因功能验证。经由正向遗传学的定位克隆方法，鉴定到自然突变体家蚕的突变靶基因所在染色体位点并对其序列进行分析，随后以野生型家蚕为材料，利用基因组靶向编辑技术通过定点突变敲除靶基因，将其表型变化与自然突变体进行对比分析以验证定位克隆的准确性。例如利用 CRISPR/Cas9 系统对野生型家蚕基因组中鸟苷酸环化酶基因 *BmGC-I* 的敲除结果显示，敲除突变体 $BmGC\text{-}I^{KO}$ 会出现与天然突变体 *quail* 幼虫相同的异常体色表型，从而证实 *BmGC-I* 基因是一个家蚕色素合成途径中起调控作用的关键基因(Yuasa *et al*., 2016)。其他通过上述方法鉴定的家蚕内源基因还包括：细胞色素沉淀相关转录因子基因 *apt-like* (Yoda *et al*., 2014)、果蝇血红素过氧化物酶编码基因(*cardinal*)在家蚕的直系同源基因 *Bm-cardinal* (Osanai-Futahashi *et al*., 2016)和棕榈酰转移酶 ZDHHC18 类似蛋白编码基因 *BmAPP*(Yu *et al*., 2017)等(表 1)。

(2)反向遗传学的基因功能分析。经信息分析筛选家蚕基因组中功能尚未完全解析的内源基因或其他昆虫物种(一般多为果蝇)已鉴定功能基因的家蚕直系同源基因为靶标，利用基因组靶向编辑技术建立靶标基因定点敲除突变体家蚕，随后通过检验敲除突变个体表型、性状的变化来研究和分析该靶标基因的功能。例如对果蝇谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)基因在家蚕的直系同源基因 *nobo-Bm*(*GSTe*7)的敲除研究结果表明，纯合基因敲除的家蚕($nobo\text{-}Bm^{\triangle 85}/nobo\text{-}Bm^{\triangle 85}$)出现的体型变短且表皮光滑的突变表型，是由于 7-脱氢胆固醇 (7-dehydrocholesterol) 在突变体家蚕前胸腺

表 1　基于人工核酸内切酶的基因组靶向编辑技术在家蚕中的应用(截止 2017 年 6 月 30 日数据)
Table 1　Application of engineered endonuclease-based genome editing technology in the silkworm *Bombyx mori* (data by June 30th, 2017)

人工核酸内切酶 Engineered endonuclease	靶基因/靶序列 Target gene/ Target sequence	作用方式 Mode of action	整合的外源基因/序列 Integrated exogenous gene/sequence	参考文献 References
ZFN	*BmBLOS2*, *Bmwh3*	基因敲除 Gene knockout	–	Takasu *et al*., 2010
	未公布 Unpublished	基因敲入 Gene knockin	*A3-GFP-SV40T*	Daimon *et al*., 2014
	BmFib-H	基因敲除 Gene knockout	–	Ma *et al*., 2014b
TALEN	*BmBLOS2*	基因敲除 Gene knockout	–	Ma *et al*., 2012; Sajwan *et al*., 2013
	BmBLOS2, *Bm-re*	基因敲除 Gene knockout	–	Takasu *et al*., 2013
	BmBLOS2, *Bm-re*, *Ser2 etc.*	基因敲除 Gene knockout	–	Takasu *et al*., 2014
	BmFib-H	基因敲除 Gene knockout	–	Wang and Nakagaki, 2014
	BmBLOS2, *Bm702*	基因敲除/基因组结构变异 Gene knockout/Genomic structure variations	–	Ma *et al*., 2014c
	BmBLOS2	基因敲除/基因敲入 Gene knockout/Gene knockin	*hsp90p-EGFP-polyA*	Nakade *et al*., 2014
	BmBLOS2	基因敲除/基因敲入 Gene knockout/Gene knockin	*HR5-IE1-DsRed2-SV40*	Wang *et al*., 2014
	apt-like	基因敲除 Gene knockout	–	Yoda *et al*., 2014
	JHAMT, *Met1*, *Met2*, *broad*	基因敲除 Gene knockout	–	Daimon *et al*., 2015
	Bmdsx^F	基因敲除 Gene knockout	–	Xu *et al*., 2014
	BmOR1	基因敲除 Gene knockout	–	Sakurai *et al*., 2015
	nobo-Bm	基因敲除 Gene knockout	–	Enya *et al*., 2015
	Bm-re	基因敲除 Gene knockout	–	Takasu *et al*., 2016
	DH-PBAN, *DHR*	基因敲除 Gene knockout	–	Shiomi *et al*., 2015
	Bm-cardinal	基因敲除 Gene knockout	–	Osanai-Futahashi *et al*., 2016
CRISPR/Cas9	*BmBLOS2*	基因敲除 Gene knockout	–	Wang *et al*., 2013c
	BmKu70	基因敲除 Gene knockout	–	Ma *et al*., 2014a
	BmWnt1	基因敲除 Gene knockout	–	Zhang *et al*., 2015
	Bm-ok, *BmKMO*, *BmTh*, *Bmtan*	基因敲除 Gene knockout	–	Wei *et al*., 2014
	BmBLOS2, *BmTh*, *Bm-re*, *Bmyellow-e*, *Bmfringe*, *Bmebony*, *BmKynu*	基因敲除/基因组结构变异 Gene knockout/Genomic structure variations	–	Liu *et al*., 2014
	BmEO	基因敲除 Gene knockout	–	Li *et al*., 2015
	Bmawd, *Bmfng*	基因敲除 Gene knockout	–	Ling *et al*., 2015
	Bmsage	基因敲除 Gene knockout	–	Xin *et al*., 2015
	BmGC-I	基因敲除 Gene knockout	–	Yuasa *et al*., 2016
	BtR-175	基因敲除 Gene knockout	–	Lin *et al*., 2015
	BmKu70, *BmKu80*, *BmLig IV*, *BmXRCC4*, *BmXLF*	基因敲除 Gene knockout	–	Zhu *et al*., 2015
	BmTUDOR-SN	基因敲除/基因敲入 Gene knockout/Gene knockin	*EGFP* 基因编码序列 *EGFP* gene coding sequence	Zhu *et al*., 2015
	BmBLOS2, *EGFP*	基因敲除 Gene knockout	–	Zeng *et al*., 2016
	ie-1	基因敲除 Gene knockout	–	Dong *et al*., 2016
	EGFP	基因敲除 Gene knockout	–	Song *et al*., 2016
	BmBLOS2, *BmP25*, *BmSericin1*, *BmSericin3*	基因敲除 Gene knockout	–	Ma *et al*., 2017
	BmSxl, *Bmtra2*, *BmImp*, *BmImp^M*, *BmPSI*, *BmMasc*	基因敲除 Gene knockout	–	Xu *et al*., 2017
	BmOrco	基因敲除 Gene knockout	–	Liu *et al*., 2017
	BmJHE	基因敲除 Gene knockout	–	Zhang *et al*., 2017
	BmFOXO	基因敲除 Gene knockout	–	Zeng *et al*., 2017
	ie-1, *me53*	基因敲除 Gene knockout	–	Chen *et al*., 2017
	BmAPP	基因敲除 Gene knockout	–	Yu *et al*., 2017

细胞中异常大量积累所导致(Enya *et al*., 2015)。其他经由上述方法鉴定的家蚕内源基因还包括:性信息素气味受体基因 *BmOR*1(Sakurai *et al*., 2015)、蜕皮激素氧化酶(ecdysone oxidase, EO)基因 *BmEO*(Li *et al*., 2015)、家蚕 *miR*-2 的靶标基因 *Bmawd* 和 *Bmfng*(Ling *et al*., 2015)、家蚕翅发育关键调控基因 *BmWnt*-1(Zhang *et al*., 2015)、家蚕气味共受体(odorant receptor coreceptor, Orco)基因 *BmOrco*(Liu *et al*., 2017)和家蚕保幼激素酯酶(juvenile hormone esterase, JHE)基因 *BmJHE*(Zhang *et al*., 2017)等(表 1)。

(3)培育新型定向改造突变家蚕品种。通过定点突变敲除某些功能已经较为明确的内源基因,从而创制出具有特定基因和表型差异的新型突变家蚕品种,随后甚至还能够经由转基因手段对该突变家蚕品种进行进一步遗传改造。例如通过敲除家蚕 $Bmdsx^F$ 基因(家蚕 *doublesex* 基因的雌特异性拼接体)来建立外生殖器和蚕卵发育异常的雌特异性不育转基因家蚕系(Xu *et al*., 2014);通过敲除家蚕 *BmFib-H* 基因制备不分泌内源 Fib-H 蛋白的"丝胶茧"突变体家蚕作为理想的生物反应器模型(Ma *et al*., 2014b; Wang and Nakagaki, 2014)。

2.3 家蚕基因组结构变异操作

基因组结构变异(genomic structure variations, GSVs)是指基因组内长度大于 1 kb 的 DNA 片段发生缺失、易位、重复、插入、倒位以及 DNA 拷贝数变异(copy number variations, CNVs)的现象。利用基因组靶向编辑技术介导实现大片段基因组 DNA 序列的删除、倒位和易位等 GSVs,需要同时对 2 个或 2 个以上的靶位点进行定点突变操作。Ma 等(2012)通过胚胎显微注射 TALEN mRNAs 的方式,获得了 *BmBLOS*2 基因序列区域约 800 bp DNA 片段缺失的人工突变体家蚕。随后,Wang 等(2013c)利用 CRISPR/Cas9 系统介导实现了家蚕个体基因组水平 *BmBLOS*2 基因约 3.5 kb DNA 大片段的高效删除。Ma 等(2014c)利用 TALEN 实现了介导长达 8.9 Mb(占整个染色体长度 1/3)的家蚕基因组大片段发生删除、重复和倒位等 GSVs,进一步的测序分析结果显示这些 GSVs 均通过 NHEJ 的 DNA 修复途径实现。此外,Ma 等(2014c)还通过将人工设计的单链寡核苷酸(single-stranded oligonucleotides, ssODN)与 TALEN mRNA 混合注射进入家蚕胚胎,实现了由 ssODN 介导的精确靶向基因组长片段 DNA 删除和倒位的 GSV 操作。Liu 等(2014)利用 CRISPR/Cas9 系统在家蚕细胞中介导实现了 *BmBLOS*2 基因 3.2 kb DNA 大片段的删除和倒位等 GSVs 操作。

2.4 家蚕外源基因的基因组定点整合操作

自 Tamura 等(2000)年建立世界上首例由 *piggyBac* 转座子随机整合获得的转基因家蚕以来,通过转基因技术介导实现外源基因在家蚕基因组的定点整合,就一直是国内外蚕学研究人员所关注的重点。

Mon 等(2004)发现在家蚕基因组特定位点引入 DSB,可以提高家蚕 BmN4 细胞中发生同源重组的效率。Daimon 等(2014)利用 ZFN 介导产生 DSB 并基于 HDR 途径实现的 GFP 基因表达框(*A3-GFP-SV40T*)在家蚕基因组定点整合的效率仅为 0.0085%(1/11 770),暗示家蚕细胞中的 DNA 断裂修复主要通过 NHEJ 途径实现。此后的相关研究结果显示,通过敲除家蚕基因组中 NHEJ 修复途径的关键基因(包括 *BmKu*70, *BmKu*80, *BmLig IV*, *BmXRCC*4 和 *BmXLF* 等),能够有效提高家蚕胚胎和家蚕 BmN4 细胞中经由 HDR 途径实现的外源基因定点整合效率(Ma *et al*., 2014a; Zhu *et al*., 2015)。Wang 等(2014)利用 TALEN 介导实现了携带同源臂序列的由组成型 hr5-ie1 启动子组合调控的 *DsRed*2 基因在家蚕 *BmBLOS*2 基因靶位点的定点整合。Nakade 等(2014)根据基于微同源重组介导末端连接(MMEJ)的修复机制,建立了 TALEN 结合目标染色体精确整合(precise integration into target chromosome, PITCh)系统的外源基因整合策略(TAL-PITCh),并实现了介导外源基因在家蚕 *BmBLOS*2 基因编码区靶位点的定点整合。此外,基于 CRISPR/Cas9 系统的 PITCh 策略(CRIS-PITCh)同样具有介导外源基因在包括家蚕、爪蟾和哺乳动物细胞基因组靶位点定点整合的潜力(Nakade *et al*., 2014)。

2.5 家蚕外源基因的点突变敲除操作

除了被用于家蚕基因组靶向编辑操作,基于 CRISPR/Cas9 系统的基因组靶向编辑技术还曾被用于家蚕细胞或个体中介导实现外源基因的点突变敲除研究。为了验证 CRISPR/Cas9 系统的敲除活性,Zeng 等(2016)和 Song 等(2016)分别利用 CRISPR/Cas9 系统在 BmN 细胞和转基因家蚕个体中实现了 *EGFP* 基因的定点敲除。最近,Dong 等(2016)在 BmN-SWU1 细胞中成功建立了基于 CRISPR/Cas9 系统的家蚕核型多角体病毒(BmNPV)复制早期必需基因 *ie*-1 持续性或病毒诱导性定点敲除体系,显著地提高了 BmN-SWU1 细胞抗 BmNPV 增殖的能

力。Chen 等(2017)利用家蚕 *piggyBac* 转座系统与 CRISPR/Cas9 系统成功建立了可持续性敲除 BmNPV 基因组的 *ie*-1 基因和 *me*53 基因的转基因家蚕,添毒实验结果表明转基因家蚕与非转基因家蚕相比具有显著的抗 BmNPV 能力。

3　家蚕基因组靶向编辑技术存在的问题及解决策略

3.1　家蚕内源靶基因定点敲除效率较低

基于 3 种不同 EEN 系统的基因组靶向编辑技术,在多种不同动植物物种中的应用具有通用性。但是由于物种差异性,导致这些系统在不同物种中介导外源基因定点敲除效率的差别较大。利用目前应用最为广泛的胚胎显微注射方法,将 EEN 蛋白的 mRNA 或表达载体(CRISPR/Cas9 系统还需共同导入 sgRNA)导入家蚕发育早期胚胎,获得的家蚕内源靶基因定点敲除效率较低,特别是涉及多基因同时敲除的操作,很难确保所有家蚕内源目标靶基因均能够实现一次性同时成功敲除(Ma *et al*., 2017)。

为提高 EEN 系统介导的家蚕个体水平靶基因定点敲除效率,目前可采取的主要策略是提高家蚕体内特别是胚胎发育极早期的 EEN 蛋白瞬时表达效率与含量。例如使用密码子优化型 Cas9 蛋白编码基因(Ma *et al*., 2014a),利用具有强启动活性的增强子-启动子(如 *HR*3-*A*4 和 *HR*3-*hsp*70)组合驱动 EEN 基因表达(Ma *et al*., 2017),或者建立由家蚕组成型启动子(如 *IE*1 和 *IE*2 启动子)或生殖腺特异型启动子(如 *nanos* 启动子)调控 EEN 基因持续性表达的转基因家蚕(Xu *et al*., 2014, 2017)等。此外,利用 *HR*3-*BmU*6 启动子组合驱动 sgRNA 表达并同时引入 IE1 蛋白表达(Ma *et al*., 2017),或者建立由 *BmU*6 启动子调控 sgRNA 持续性稳定表达的家蚕转基因细胞系(Zhu *et al*., 2015)或转基因个体(Zeng *et al*., 2016),均能够实现提高 CRISPR/Cas9 系统介导的家蚕内源基因定点敲除效率。

3.2　家蚕外源基因定点整合效率较低

由于物种差异性所带来的染色体数量和 DNA 序列复杂度不同,相对于目前报道的利用基因组靶向编辑系统借助 HDR 机制,在果蝇和蚊子中实现外源基因定点整合的高效性(Yu *et al*., 2014; Kistler *et al*., 2015),利用 HDR 途径实现介导外源基因在家蚕基因组定点整合的效率普遍较低,且整合的外源基因或 DNA 片段大小较为有限(<5 kb)(Daimon *et al*., 2014; Nakade *et al*., 2014; Wang *et al*., 2014)。为提高外源基因在家蚕基因组的整合效率,除了同样需要提高 EEN 蛋白在家蚕体内的表达效率和含量之外,还需要在进一步探明家蚕中基于 HDR 机制的 HR 修复通路与其他物种异同的研究基础上,开发出适用于家蚕的基因敲入方法(马三垣和夏庆友, 2015)。

3.3　外源基因整合存在“脱靶效应”问题

基因组靶向编辑技术的“脱靶效应(off-target effects)”是指 EEN 蛋白或 sgRNA 与非靶点 DNA 序列错配,并引入非预期基因突变的现象(Gaj *et al*., 2013)。“脱靶效应”造成了研究中的许多不确定性,从而严重制约了 EEN 介导的基因组靶向编辑技术的广泛应用与发展。Wang 等(2014)曾观察到 TALEN 介导外源基因整合于家蚕基因组靶位点以外染色体位点的“脱靶效应”现象。虽然目前尚未有 CRISPR/Cas9 系统应用于家蚕基因组编辑研究的脱靶现象报道,但是其可能存在的“脱靶效应”问题尚不能完全排除。

家蚕基因组靶向编辑技术的“脱靶效应”问题主要涉及 2 个方面:一是如何检测已经发生的“脱靶效应”,二是如何最大限度地降低脱靶风险。目前在家蚕中仍旧主要采用克隆测序的方法来验证软件预测的可能发生“脱靶效应”的基因组 DNA 序列(Wei *et al*., 2014; Xin *et al*., 2015),而包括 ChIP-seq 技术(Duan *et al*., 2014; Kuscu *et al*., 2014)、GUIDE-seq 技术(Tsai *et al*., 2015)、整合酶缺陷的慢病毒载体(IDLV)检测法(Wang *et al*., 2015)和 Digenome-seq 技术(Kim *et al*., 2015)等,均具有应用于在全基因组范围内检测家蚕或其他动植物物种基因组靶向编辑系统“脱靶效应”的潜力。目前可参考应用于降低以 CRISPR/Cas9 系统为代表的家蚕基因组靶向编辑技术脱靶风险的主要策略包括:(1)通过精确的人工设计(Hsu *et al*., 2013),并经全基因组序列生物信息学比对分析或使用 CRISPR Design(Hsu *et al*., 2013)和 CRISPRdirect(Naito *et al*., 2015)等在线软件设计具有结合特异性的 sgRNA 序列;(2)利用突变型 Cas9 切口酶(Cas9n)结合双切口酶策略(double-nicking strategy)切割靶序列(Ran *et al*., 2013; Shen *et al*., 2014);(3)利用突变体 Cas9 蛋白(dCas9)(Kuscu *et al*., 2014)与 FokⅠ核酸酶结合形成的融合蛋白 fCas9(FokⅠ-dCas9)通过二聚化方式切割靶序列(Guilinger *et al*., 2014; Tsai *et al*., 2014);(4)利用 eSpCas9 和

SpCas9-HF1 等新型 Cas9 蛋白切割靶序列(Kleinstiver *et al*., 2016; Slaymaker *et al*., 2016);(5)采用能够降低 Cas9 蛋白错配容忍度的缩短型 sgRNA 识别靶序列(Fu *et al*., 2014),或者通过降低 gRNA 的浓度和(或)Cas9 蛋白 mRNA 在细胞中的表达量(Fu *et al*., 2013; Hsu *et al*., 2013)、采用细胞穿透肽(cell penetrating peptides)来介导 Cas9 蛋白与 gRNA 进入宿主细胞(Ramakrishna *et al*., 2014)等优化的实验方法体系,均能使脱靶风险显著降低。

4 家蚕基因组靶向编辑技术发展与展望

4.1 优化突变体家蚕的筛选方法

目前应用最为普遍的经由 EEN 蛋白 mRNA 瞬时表达获得的基因敲除突变体家蚕,其筛选策略主要是通过观察表型结合突变位点序列 PCR 产物测序的方式。其中观察表型的方法适用于鉴定敲除后会引起明显表型变化的目标基因,如 *BmBLOS*2(Takasu *et al*., 2010)和 *Bm-ok*(Wei *et al*., 2014)等;针对敲除后无明显表型变化的目标基因,目前则只能经大量的测序验证以鉴定靶基因敲除个体,如 *BmKu*70(Ma *et al*., 2014a)和 *BtR*-175(Lin *et al*., 2015)等。由于 EEN 蛋白 mRNA 瞬时表达介导产生基因敲除突变体家蚕的效率较低,导致 PCR 产物直接测序方式的实验工作量巨大,因而该方法并不适用于所有实验室的推广应用。分别建立表达 Cas9 蛋白和表达 sgRNA 的不同转基因家蚕系,通过杂交方式实现靶基因在双转基因后代家蚕基因组中的高效定点敲除(Xu *et al*., 2014; Zhu *et al*., 2015),是一种较为有效且值得推广的获得无明显表型变化靶基因定点敲除个体的方法。此外,尝试通过 TAL-PITCh 或 CRIS-PITCh(Nakade *et al*., 2014)等技术介导 *EGFP*、*DsRed* 等筛选标记基因在突变靶位点的定点整合,也无疑是可实现对基因敲除突变体家蚕快速筛选的有效策略之一。

4.2 实现多基因同时修饰

众所周知,生物学性状大多由 1 个甚至多个基因网络共同协调决定,而并非由单个基因所调控,所以通常情况下单基因突变并不能获得较为理想的可供研究的表型。以推动家蚕基因功能及品种选育研究发展为目标,通过从单个基因修饰到多基因的同时编辑操作,来实现对多基因共同决定生物性状的研究,是家蚕基因组靶向编辑技术的发展趋势之一。目前利用 CRISPR/Cas9 系统实现家蚕多基因同时敲除的可行性已经在家蚕细胞和胚胎中获得证实(Liu *et al*., 2014)。另外,基于 *piggyBac* 转座子的家蚕转基因技术也有与 CRISPR/Cas9 系统联合应用于实现家蚕基因组多基因同时敲除的潜力。

4.3 基因组靶向编辑系统的联合应用与多元化开发

最近,Zeng 等(2016)发现家蚕内源性 RNA 聚合酶Ⅲ启动子——*BmU*6 启动子具有调控任意碱基类型核苷酸(A, T, C 和 G)起始转录的活性,从而使得 sgRNA 识别靶位点由通常的 GN19NGG 或 GGN18NGG 序列形式扩展为 N20NGG 的序列形式。此外,除了目前应用最为广泛的 ZFN, TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统,包括 SaCas9 和 AsCpf1 等靶向不同 PAM 序列的新型 EEN 系统,最近也被证实具有应用于家蚕基因组靶向编辑的潜力,从而极大地拓展了 CRISPR 系统在家蚕基因组中的识别位点数量(Ma *et al*., 2017)。目前理论上利用基因组靶向编辑系统可实现对家蚕基因组所有基因的定点修饰,但是包括基因序列长度、GC 含量、碱基排列顺序等因素的不同,都将极大地影响基因组靶向编辑系统对目标基因的定点修饰活性。因此,联合应用多种不同 EEN 系统实现对更大范围的家蚕内源基因的精确定点修饰,将是未来家蚕基因组靶向编辑技术研究的重要发展方向之一。

另外,通过人工改造 TALEN 或 Cas9 蛋白的氨基酸序列和结构,使之与转录激活因子、转座酶等效应元件组成融合蛋白,进而实现对外源报告基因在家蚕细胞表达的精确调控(Wang *et al*., 2013a);将 TAL 与 *piggyBac* 转座酶基因融合表达,以实现提高转座子介导外源基因在家蚕基因组的整合效率(Ye *et al*., 2015)等有益尝试,都将极大地拓展家蚕基因组靶向编辑系统的多元化开发与应用。可以预见,利用家蚕基因组靶向编辑技术,将有望促进蚕桑丝绸业界长期关注却难以解决的蚕丝遗传改良、丝腺生物反应器开发等问题的快速突破。

参考文献(References)

Beerli RR, Barbas CF, 2002. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nat. Biotechnol*., 20(2): 135-141.

Boch J, Bonas U, 2010. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol*., 48: 419-436.

Canver MC, Bauer DE, Dass A, Yien YY, Chung J, Masuda T, Maeda T, Paw B, Orkin SH, 2014. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. *J.*

Biol. Chem., 289(31): 21312 –21324.

Carroll D, 2011. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188(4): 773 –782.

Carroll D, Morton J, Beumer K, Segal D, 2006. Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases. *Nat. Protoc.*, 1(3): 1329 –1341.

Chen S, Hou C, Bi H, Wang Y, Xu J, Li M, James A, Huang Y, Tan A, 2017. Transgenic clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9-mediated viral gene targeting for antiviral therapy of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J. Virol.*, 91(8): e02465-16.

Cong L, Ran F, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P, Wu X, Jiang W, Marraffini L, Zhang F, 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121): 819 –823.

Daimon T, Kiuchi T, Takasu Y, 2014. Recent progress in genome engineering techniques in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Growth Differ.*, 56(1): 14 –25.

Daimon T, Uchibori M, Nakao H, Sezutsu H, Shinoda T, 2015. Knockout silkworms reveal a dispensable role for juvenile hormones in holometabolous life cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(31): E4226 –E4235.

Dong ZQ, Chen TT, Zhang J, Hu N, Cao MY, Dong FF, Jiang YM, Chen P, Lu C, Pan MH, 2016. Establishment of a highly efficient virus-inducible CRISPR/Cas9 system in insect cells. *Antiviral Res.*, 130: 50 –57.

Duan J, Lu G, Xie Z, Lou M, Luo J, Guo L, Zhang Y, 2014. Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome. *Cell Res.*, 24(8): 1009 –1012.

Enya S, Daimon T, Igarashi F, Kataoka H, Uchibori M, Sezutsu H, Shinoda T, Niwa R, 2015. The silkworm glutathione S-transferase gene *noppera-bo* is required for ecdysteroid biosynthesis and larval development. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 61: 1 –7.

Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD, 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.*, 31(9): 822 –826.

Fu Y, Sander J, Reyon D, Cascio V, Joung J, 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.*, 32(3): 279 –284.

Fujii T, Abe H, Katsuma S, Mita K, Shimada T, 2008. Mapping of sex-linked genes onto the genome sequence using various aberrations of the Z chromosome in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 38(12): 1072 –1079.

Fujii T, Daimon T, Uchino K, Banno Y, Katsuma S, Sezutsu H, Tamura T, Shimada T, 2010. Transgenic analysis of the *BmBLOS2* gene that governs the translucency of the larval integument of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 19(5): 659 –667.

Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.*, 31(7): 397 –405.

Guilinger J, Thompson D, Liu D, 2014. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat. Biotechnol.*, 32(6): 577 –582.

Han J, Zhang J, Chen L, Shen B, Zhou J, Hu B, Du Y, Tate P, Huang X, Zhang W, 2014. Efficient *in vivo* deletion of a large imprinted lncRNA by CRISPR/Cas9. *RNA Biol.*, 11(7): 829 –835.

Heidi S, Jens B, 2011. TAL effectors are remote controls for gene activation. *Curr. Opin. Microbiol.*, 14(1): 47 –53.

Hsu P, Scott D, Weinstein J, Ran F, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine E, Wu X, Shalem O, Cradick T, Marraffini L, Bao G, Zhang F, 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.*, 31(9): 827 –832.

Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A, 1988. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.*, 169(2): 5429 –5433.

Jansen R, Embden J, Gaastra W, Schouls L, 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.*, 43(6): 1565 –1575.

Jasin M, Rothstein R, 2013. Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5: a012740.

Jens B, Heidi S, Sebastian S, Angelika L, Simone H, Sabine K, Thomas L, Anja N, Ulla B, 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959): 1509 –1512.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E, 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096): 816 –821.

Ju CX, Zhao J, Gao X, 2015. Genome editing technologies and model animal. *Chin. Bull. Life Sci.*, 27(1): 2 –11. [琚存祥，赵静，高翔，2015. 基因组编辑技术与模式动物. 生命科学，27(1)：2 –11]

Kim D, Bae S, Park J, Kim E, Kim S, Yu HY, Hwang J, Kim JI, Kim JS, 2015. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat. Methods*, 12(3): 237 –243.

Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S, 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(3): 1156 –1160.

Kistler KE, Vosshall LB, Matthews BJ, 2015. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep.*, 11(1): 51 –60.

Kleinstiver B, Pattanayak V, Prew M, Tsai S, Nguyen N, Zheng Z, Joung J, 2016. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529(7587): 490 –495.

Kuscu C, Arslan S, Singh R, Thorpe J, Adli M, 2014. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat. Biotechnol.*, 32(7): 677 –683.

Li Y, Cao G, Chen H, Jia H, Xue R, Gong C, 2010. Expression of the hGM-CSF in the silk glands of germline of gene-targeted silkworm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391(3): 1427 –1431.

Li Z, You L, Zeng B, Ling L, Xu J, Chen X, Zhang Z, Palli SR, Huang Y, Tan A, 2015. Ectopic expression of ecdysone oxidase impairs tissue degeneration in *Bombyx mori*. *Proc. Biol. Sci.*, 282(1809): 20150513.

Lin P, Cheng T, Jin S, Wu Y, Fu B, Long R, Xia Q, Zhao P, 2015. PC, a novel oral insecticidal toxin from *Bacillus bombysepticus* involved in host lethality via APN and BtR-175. *Sci. Rep.*, 5: 11101.

Ling L, Ge X, Li Z, Zeng B, Xu J, Chen X, Shang P, James A, Huang Y, Tan A, 2015. MiR-2 family targets *awd* and *fng* to regulate wing morphogenesis in *Bombyx mori*. *RNA Biol.*, 12(7): 742 – 748.

Liu Q, Liu W, Zeng B, Wang G, Hao D, Huang Y, 2017. Deletion of the *Bombyx mori* odorant receptor co-receptor (*BmOrco*) impairs olfactory sensitivity in silkworms. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 86: 58 – 67.

Liu Q, Segal D, Ghiara J, Barbas C, 1997. Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(11): 5525 – 5530.

Liu Y, Ma S, Wang X, Chang J, Gao J, Shi R, Zhang J, Lu W, Liu Y, Zhao P, Xia Q, 2014. Highly efficient multiplex targeted mutagenesis and genomic structure variation in *Bombyx mori* cells using CRISPR/Cas9. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 49: 35 – 42.

Ma S, Chang J, Wang X, Liu Y, Zhang J, Lu W, Gao J, Shi R, Zhao P, Xia Q, 2014a. CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of *BmKu*70 in *Bombyx mori*. *Sci. Rep.*, 4: 528.

Ma S, Shi R, Wang X, Liu Y, Chang J, Gao J, Lu W, Zhang J, Zhao P, Xia Q, 2014b. Genome editing of *BmFib-H* gene provides an empty *Bombyx mori* silk gland for a highly efficient bioreactor. *Sci. Rep.*, 4: 6867.

Ma S, Wang X, Liu Y, Gao J, Zhang S, Shi R, Chang J, Zhao P, Xia Q, 2014c. Multiplex genomic structure variation mediated by TALEN and ssODN. *BMC Genomics*, 15: 41.

Ma S, Yue L, Liu Y, Chang J, Zhang T, Wang X, Shi R, Lu W, Xia X, Zhao P, Xia Q, 2017. An integrated CRISPR *Bombyx mori* genome editing system with improved efficiency and expanded target sites. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 83: 13 – 20.

Ma S, Zhang S, Wang F, Liu Y, Liu Y, Xu H, Liu C, Lin Y, Zhao P, Xia Q, 2012. Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs. *PLoS ONE*, 7(9): e45035.

Ma SY, Xia QY, 2015. Genome editing brings a new era of silkworm research. *Sci. Seric.*, 41(2): 195 – 203. [马三垣, 夏庆友, 2015. 基因组编辑开启家蚕研究新纪元. 蚕业科学, 41(2): 195 – 203]

Makarova K, Haft D, Barrangou R, Brouns S, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica F, Wolf Y, Yakunin A, van der Oost J, Koonin E, 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9(6): 467 – 477.

Mali P, Yang L, Esvelt K, Aach J, Guell M, DiCarlo J, Norville J, Church G, 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121): 823 – 826.

Marraffini LA, Sontheimer EJ, 2009. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 322(5909): 1843 – 1845.

Marraffini LA, Sontheimer EJ, 2010. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Genet.*, 11(3): 181 – 190.

Miller J C, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.*, 29(2): 143 – 148.

Miller J, Mclachlan AD, Klug A, 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J.*, 4(6): 1609 – 1614.

Mon H, Kusakabe T, Lee JM, Kawaguchi Y, Koga K, 2004. *In vivo* DNA double-strand breaks enhance gene targeting in cultured silkworm cells. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 139(1): 99 – 106.

Moscou MJ, Bogdanove AJ, 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326(5959): 1501.

Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K, 2015. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 31(7): 1120 – 1123.

Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T, Suzuki K, 2014. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat. Commun.*, 5: 5560.

Osanai-Futahashi M, Tatematsu KI, Futahashi R, Narukawa J, Takasu Y, Kayukawa T, Shinoda T, Ishige T, Yajima S, Tamura T, Yamamoto K, Sezutsu H, 2016. Positional cloning of a *Bombyx* pink-eyed white egg locus reveals the major role of cardinal in ommochrome synthesis. *Heredity*, 116(2): 135 – 145.

Porteus M, Carroll D, 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat. Biotechnol.*, 23(8): 967 – 973.

Ramakrishna S, Kwaku Dad A, Beloor J, Gopalappa R, Lee S, Kim H, 2014. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.*, 24(6): 1020 – 1027.

Ramalingam S, Annaluru N, Chandrasegaran S, 2013. A CRISPR way to engineer the human genome. *Genome Biol.*, 14(2): 107.

Ran F, Hsu P, Lin C, Gootenberg J, Konermann S, Trevino A, Scott D, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F, 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6): 1380 – 1389.

Sajwan S, Takasu Y, Tamura T, Uchino K, Sezutsu H, Zurovec M, 2013. Efficient disruption of endogenous *Bombyx* gene by TAL effector nucleases. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 43(1): 17 – 23.

Sakurai T, Mitsuno H, Mikami A, Uchino K, Tabuchi M, Zhang F, Sezutsu H, Kanzaki R, 2015. Targeted disruption of a single sex pheromone receptor gene completely abolishes *in vivo* pheromone response in the silkmoth. *Sci. Rep.*, 5: 12594.

Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, Wang L, Hodgkins A, Iyer V, Huang X, Skarnes W, 2014. Efficient

genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat. Methods*, 11(4): 399 – 402.

Shiomi K, Takasu Y, Kunii M, Tsuchiya R, Mukaida M, Kobayashi M, Sezutsu H, Ichida Takahama M, Mizoguchi A, 2015. Disruption of diapause induction by TALEN-based gene mutagenesis in relation to a unique neuropeptide signaling pathway in *Bombyx*. *Sci. Rep.*, 5: 15566.

Slaymaker I, Gao L, Zetsche B, Scott D, Yan W, Zhang F, 2016. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351(6268): 84 – 88.

Song J, Che J, You Z, Ye X, Li J, Ye L, Zhang Y, Qian Q, Zhong B, 2016. The clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated proteins system for the induction of gene mutations and phenotypic changes in *Bombyx mori*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 48(12): 1112 – 1119.

Takasu Y, Kobayashi I, Beumer K, Uchino K, Sezutsu H, Sajwan S, Carroll D, Tamura T, Zurovec M, 2010. Targeted mutagenesis in the silkworm *Bombyx mori* using zinc finger nuclease mRNA injection. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 40(10): 759 – 765.

Takasu Y, Sajwan S, Daimon T, Osanai-Futahashi M, Uchino K, Sezutsu H, Tamura T, Zurovec M, 2013. Efficient TALEN construction for *Bombyx mori* gene targeting. *PLoS ONE*, 8(9): e73458.

Takasu Y, Tamura T, Goldsmith M, Zurovec M, 2016. Targeted mutagenesis in *Bombyx mori* using TALENs. *Methods Mol. Biol.*, 1338: 127 – 142.

Takasu Y, Tamura T, Sajwan S, Kobayashi I, Zurovec M, 2014. The use of TALENs for nonhomologous end joining mutagenesis in silkworm and fruitfly. *Methods*, 69(1): 46 – 57.

Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Kômoto N, Thomas J, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme J, Couble P, 2000. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.*, 18(1): 81 – 84.

Tsai S, Wyvekens N, Khayter C, Foden J, Thapar V, Reyon D, Goodwin M, Aryee M, Joung J, 2014. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.*, 32(6): 569 – 576.

Tsai S, Zheng Z, Nguyen N, Liebers M, Topkar V, Thapar V, Wyvekens N, Khayter C, Iafrate A, Le L, Aryee M, Joung J, 2015. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat. Biotechnol.*, 33(2): 187 – 197.

Wang F, Ma S, Xu H, Duan J, Wang Y, Ding H, Liu Y, Wang X, Zhao P, Xia Q, 2013a. High-efficiency system for construction and evaluation of customized TALENs for silkworm genome editing. *Mol. Genet. Genomics*, 288(12): 683 – 690.

Wang H, Yang H, Shivalila C, Dawlaty M, Cheng A, Zhang F, Jaenisch R, 2013b. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4): 910 – 918.

Wang X, Wang Y, Wu X, Wang J, Wang Y, Qiu Z, Chang T, Huang H, Lin R, Yee J, 2015. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat. Biotechnol.*, 33(2): 175 – 178.

Wang Y, Li Z, Xu J, Zeng B, Ling L, You L, Chen Y, Huang Y, Tan A, 2013c. The CRISPR/Cas System mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*. *Cell Res.*, 23(2): 1414 – 1416.

Wang Y, Tan A, Xu J, Li Z, Zeng B, Ling L, You L, Chen Y, James A, Huang Y, 2014. Site-specific, TALENs-mediated transformation of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 55: 26 – 30.

Wang YJ, Nakagaki M, 2014. Editing of the heavy chain gene of *Bombyx mori* using transcription activator like effector nucleases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 450(1): 184 – 188.

Wei W, Xin H, Roy B, Dai J, Miao Y, Gao G, 2014. Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 9(7): e101210.

Wu X, Cao C, 2004. Targeting of human aFGF gene into silkworm, *Bombyx mori* L. through homologous recombination. *J. Zhejiang Univ. Sci.*, 5(6): 644 – 650.

Wyman C, Kanaar R, 2006. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.*, 40: 363 – 383.

Xia Q, Li S, Feng Q, 2014. Advances in silkworm studies accelerated by the genome sequencing of *Bombyx mori*. *Annu. Rev. Entomol.*, 59: 513 – 536.

Xin H, Zhang D, Chen R, Cai Z, Lu Y, Liang S, Miao Y, 2015. Transcription factor Bmsage plays a crucial role in silk gland generation in silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 90(2): 59 – 69.

Xu J, Chen S, Zeng B, James A, Tan A, Huang Y, 2017. *Bombyx mori* P-element somatic inhibitor (*BmPSI*) is a key auxiliary factor for silkworm male sex determination. *PLoS Genet.*, 13(1): e1006576.

Xu J, Wang Y, Li Z, Ling L, Zeng B, James A, Tan A, Huang Y, 2014. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated female-specific sterility in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 23(6): 800 – 807.

Xue R, Chen H, Cui L, Cao G, Zhou W, Zheng X, Gong C, 2012. Expression of hGM-CSF in silk glands of transgenic silkworms using gene targeting vector. *Transgenic Res.*, 21(1): 101 – 111.

Yamao M, Katayama N, Nakazawa H, Yamakawa M, Hayashi Y, Hara S, Kamei K, Mori H, 1999. Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus. *Genes Dev.*, 13(5): 511 – 516.

Ye L, You Z, Qian Q, Zhang Y, Che J, Song J, Zhong B, 2015. TAL effectors mediate high-efficiency transposition of the *piggyBac* transposon in silkworm *Bombyx mori* L. *Sci. Rep.*, 5: 17172.

Yoda S, Yamaguchi J, Mita K, Yamamoto K, Banno Y, Ando T, Daimon T, Fujiwara H, 2014. The transcription factor Apontic-like controls diverse colouration pattern in caterpillars. *Nat. Commun.*, 5: 4936.

Yu Y, Liu X, Ma X, Zhang Z, Liu N, Hou C, Li M, 2017. Mutation of a palmitoyltransferase *ZDHHC18-like* gene is responsible for the minute wing mutation in the silkworm (*Bombyx mori*). *BioRxiv*, DOI: http://dx.doi.org/10.1101/101618.

Yu Z, Chen H, Liu J, Zhang H, Yan Y, Zhu N, Guo Y, Yang B,

Chang Y, Dai F, Liang X, Chen Y, Shen Y, Deng WM, Chen J, Zhang B, Li C, Jiao R, 2014. Various applications of TALEN- and CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination to modify the *Drosophila* genome. *Biol. Open.*, 3(4): 271－280.

Yuasa M, Kiuchi T, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, 2016. Identification of the silkworm quail gene reveals a crucial role of a receptor guanylyl cyclase in larval pigmentation. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 68: 33－40.

Zeng B, Huang Y, Xu J, Shiotsuki T, Bai H, Palli S, Huang Y, Tan A, 2017. The FOXO transcription factor controls insect growth and development by regulating juvenile hormone degradation in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 292(28): 11659－11669.

Zeng B, Zhan S, Wang Y, Huang Y, Xu J, Liu Q, Li Z, Huang Y, Tan A, 2016. Expansion of CRISPR targeting sites in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 72: 31－40.

Zhang F, Cong L, Lodato S, Kosuri S, Church GM, Arlotta P, 2011. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat. Biotechnol.*, 29(2): 149－153.

Zhang Z, Aslam AFM, Liu X, Li M, Huang Y, Tan A, 2015. Functional analysis of *Bombyx Wnt*1 during embryogenesis using the CRISPR/Cas9 system. *J. Insect Physiol.*, 79: 73－79.

Zhang Z, Liu X, Shiotsuki T, Wang Z, Xu X, Huang Y, Li M, Li K, Tan A, 2017. Depletion of juvenile hormone esterase extends larval growth in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 81: 72－79.

Zhou J, Shen B, Zhang W, Wang J, Yang J, Chen L, Zhang N, Zhu K, Xu J, Hu B, Leng Q, Huang X, 2014. One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 46: 49－55.

Zhu L, Mon H, Xu J, Lee J M, Kusakabe T, 2015. CRISPR/Cas9-mediated knockout of factors in non-homologous end joining pathway enhances gene targeting in silkworm cells. *Sci. Rep.*, 5: 18103.

(责任编辑：马丽萍)